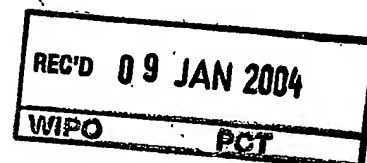


ROYAUME DE BELGIQUE



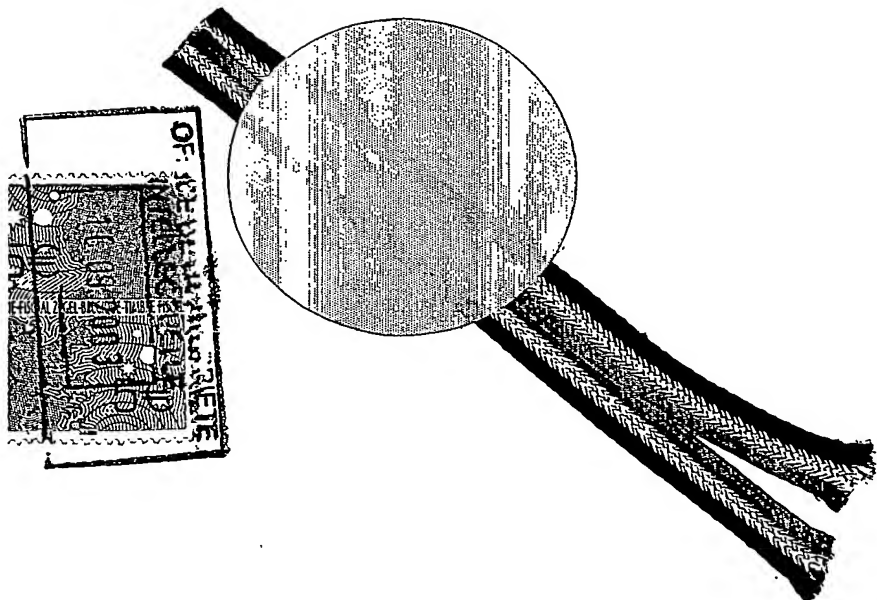
Il est certifié que les annexes à la présente sont la copie fidèle de documents accompagnant une demande de brevet d'invention tels que déposée en Belgique suivant les mentions figurant au procès-verbal de dépôt ci-joint.

Bruxelles, le 16. -9- 2003

Pour le Directeur de l'Office
de la Propriété industrielle

Le fonctionnaire délégué,

BAILLEUX G.
Conseiller adjoint



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



PROCES-VERBAL DE DEPOT D'UNE
DEMANDE BREVET D'INVENTION

ADMINISTRATION DE LA POLITIQUE COMMERCIALE
Office de la Propriété Industrielle

N° 2002/0649

Aujourd'hui, le 14/11/2002 à Bruxelles, 24 heures 00 minutes

en dehors des heures d'ouverture de bureau de dépôt, l'OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE a reçu un envoi postal contenant une demande en vue d'obtenir un brevet d'invention relatif à UTILISATION DE PROTEINES ET POLYPEPTIDES DERIVES.

introduite par COLENS Alain

agissant pour : UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES
Avenue F.D. Roosevelt 50, CP 165
B-1050 BRUXELLES - BELGIQUE

En tant que ☒ mandataire agréé
☐ avocat
☐ établissement effectif du demandeur
☐ le demandeur

La demande, telle que déposée, contient les documents nécessaires pour obtenir une date de dépôt conformément à l'article 16, § 1er de la loi du 28 mars 1984.

Le fonctionnaire délégué,

S. DRISQUE

Bruxelles, le 14/11/2002

DEMANDE REJETEE

Utilisation de protéines et polypeptides dérivés

5 L'invention concerne l'utilisation de protéines,
naturelles ou modifiées, notamment pour le traitement
thérapeutique et/ou la prévention de maladies , en
particulier mais pas uniquement chez l'homme. L'invention
concerne également des nucléotides dont la séquence
10 correspond, entièrement ou partiellement à celle de ces
protéines ainsi que des procédés de diagnostic ou de
dosage faisant appel auxdites protéines, y compris
certains anti-corps adaptés, et les méthodes de
diagnostic dérivées.

15 En particulier, l'invention propose un traitement contre
l'infection par le trypanosome de type T.b. rhodesiense
chez l'homme.

20 On sait en effet que Trypanosoma brucei brucei est
toujours sensible au sérum humain alors que T.b.
rhodesiense peut être résistant ou non selon des
variations antigéniques.

25 L'invention se rapporte également à un procédé d'obtention
d'un bétail résistant aux trypanosomes.

30 La maladie due au trypanosome (Nagana) empêche l'élevage du
bétail sur plus d'un tiers du continent africain, avec pour
résultat, selon certaines estimations, que ce continent ne
produit pas 20% de ce qu'il pourrait produire en termes de
viandes, de lait etc.

Il a déjà été proposé que la résistance de certaine sous-espèces de trypanosomes à l'action lytique du sérum humain normal (NHS, Normal Human Serum) est due à un gène encodant la résistance sous la forme d'une protéine apparentée aux glycoprotéines de surface (VSG : Variant Surface Glycoprotein), plus particulièrement une telle protéine tronquée qui a été dénommée protéine SRA (Serum Resistance Associated).

La séquence de la protéine RSA est discutée dans Mol. Biochem. Parasitol., 68, 277-284 (1994) De Greef et al.

Il est reconnu que le facteur lytique du NHS est associé à la fraction HDL (High Density Lipoprotéine) du sérum. On a proposé en particulier l'intervention de protéine de type haptoglobine (Hpr).

Selon l'invention, on a maintenant constaté de manière surprenante que la protéine responsable de l'action lytique du sérum humain normal (NHS) est en fait une protéine connue sous le nom d'apolipoprotéine L-I, présente généralement à une concentration de 6 à 9 microg/ml.

La séquence de l'apolipoprotéine L-1 (ApoL-I) est décrite par Page et al. , Genomics 74, 71-78 (2001) et comprend 398 acides aminés.

Cette fonctionnalité de l'apoL-1 n'avait jamais été proposée dans la littérature et permet l'obtention de cette protéine, ainsi que de protéines dérivées ou analogues, dans un but thérapeutique, prophylactique,

diagnostique ou analytique. Ces composés peuvent entre autres servir pour la prévention, le diagnostic et le traitement de la maladie du sommeil chez l'homme.

5 Selon un autre aspect de l'invention, on propose l'obtention de bétail transgénique produisant de l'ApoL-I. Le bétail est rendu résistant grâce à l'introduction de manière connue d'un gène produisant l'apoL-I ou un peptide actif dérivé de l'apoL-I. Par exemple, l'apoL-I peut être
10 avantageusement produit par un gène sous dépendance d'un promoteur de transcription de cellules endothéliales.

Selon l'invention, on a donc décelé et étudié
15 les sites d'interaction entre la protéine SRA et l'apoL-I, ce qui permet la conception de protéines modifiées, et généralement simplifiées, aptes à interagir efficacement avec la protéine SRA et définir ainsi un traitement pour empêcher la résistance de trypanosomes résistants à
20 l'action lytique du sérum humain.

Selon l'invention, l'apo L est plus particulièrement intéressante à son extrémité C en particulier au niveau des acides aminés (aa) 343-398 (hélice alpha
25 amphipathique). On a en effet démontré que cette séquence interagit avec la séquence 54-65 de la protéine SRA et que cette interaction est la cause de la résistance conférée à Trypanosomia b. rhodensiensis vis à vis du sérum humain.

30 On a en effet démontré que l'apo-L (aa 1-342), c'est à dire substantiellement sans sa séquence terminale, garde ses propriétés lytiques, mais est insensible à toutes interactions avec le facteur résistant SRA, et est ainsi

actif contre les trypanosomes résistants et non résistants.

5 Cette protéine tronquée peut donc être utilisée, telle
qu'elle ou sous forme dérivée, comme principe actif
(médicament) pour le traitement de la maladie du sommeil
chez l'homme, ou d'autres infections sensibles à cet
agent. On peut aussi exprimer cette protéine de manière
connue chez un bovin et créer une race transgénique
résistante aux moins à certains trypanosomes.

10 L'application des anticorps anti-SRA ou -protéine dérivée
, y compris dans le cadre de la vaccination (obtention de
dérivés SRA antigéniques), fait également partie de la
15 présente invention.

Les anticorps peuvent aussi être produits plus
particulièrement pour le dosage de l'apolipoprotéine chez
l'homme. Le dosage peut être basé par exemple sur
20 l'interaction des protéines apo-L-1 et SRA. En pratique,
l'apo-L-1 ou la protéine SRA est présente en phase
immobilisée et détectée par un anticorps. Une technique
de type ELISA est facilement adaptée.

25 L'apoL ou ses dérivés peuvent donc être utilisés comme
marqueur diagnostique dans un système de capture basé sur
la SRA ou basé sur les anticorps monoclonaux ou
polyclonaux contre l'Apo-L.

30 L'invention permet ainsi la détection et le dosage de
l'apoL-I dans le sérum humain en utilisant la protéine
SRA, ou un fragment actif dérivé de celle-ci, comme ligand
suivi d'une détection classique par exemple par anticorps.

On sait par ailleurs, que le taux d'ApoL pourrait refléter l'activité lipolytique et ainsi fournir des indications relatives au risque cardio-vasculaire d'un patient (voir par ex. J. of Lipid Research, p. 1231, Vol 41, 2000.).

On comprendra également que l'apoL-I et/ou un anticorps contre apoL, est apte à moduler la lipolyse chez l'homme:

- l'ApoL (variants, mutants, peptides dérivés) pourrait constituer un agent thérapeutique pour moduler la lipolyse, et fournir ainsi un nouvel agent de prévention des maladies cardio-vasculaires
- de même des anticorps monoclonaux humanisés, dressés contre ApoL, pourraient constituer des outils thérapeutiques pour la modulation de la lipolyse dans les cas aigus.

On a récemment rapporté que le gène qui serait responsable de la schizophrénie (sur le chromosome 22) est corrélé avec le gène de l'apoprotéine L-I. Des tissus de cortex préfrontal chez les schizophrènes révèlent en effet une augmentation anormale de l'apoL-I. Les protéines, acides nucléiques ou peptides selon l'invention peuvent donc servir à diagnostiquer, et/ou à traiter la schizophrénie dans la mesure où cette surproduction s'avère être un facteur causal de la pathologie.

Enfin, l'invention propose un procédé de purification de l'apoL-I comprenant l'étape d'association de cette protéine à une protéine SRA, par exemple fixée sur une résine adéquate, ou à une protéine dérivée contenant la région aa32-97 ou plus spécifiquement la région aa54-56.

Dans les revendications, par "substantiellement" on entend

que l'homme de métier confronté au deux séquences considérera que la similitude est suffisamment significative pour soupçonner une relation en terme de fonctionnalité ou d'origine des séquences.

5

L'annexe qui suit fournit diverses références relatives à l'infection par Trypanosomes et le rôle des apopolipoprotéines du type HDL dans ce cadre.

10

L'invention est illustrées dans les figures en annexe produites à titre d'exemples uniquement, ainsi que par les descriptions expérimentales qui suivent.

15

La fig. 1 illustre l'expression du SRA, et phénotype de T.b.brucei transfecté avec pTSARib. Les résultats Western plot obtenus avec les anticorps sont montrés pour des clones T.b. rhodesiense ETat 1.2 où le SRA est exprimé (R) ou non (S)⁴, et pour différents transformants de T.b. brucei. Le vecteur pTSARib comprend, ou non (-), différentes versions du SRA (WT =wild type, del= délété du peptide indiqué; SRA/VSG-chimères associant les peptides SRA1-192 au VSG 288-490). Les cellules sont analysées par le test de résistance au sérum humain (HSRT) in vivo et in vitro, et déterminées ainsi soit comme résistantes (R) soit comme sensibles (S). Les transformants sont cultivés dans des souris en présence de sérum foetal de bovin (FCS) ou de NHS. La signification de la bande à 45 kDa (astérique) n'est pas connue.

30

La fig. 3 illustre la liaison de l'apoL-I au SRA
a - Diagramme de protéines NHS liées à des résines contenant aucune protéine (-), ou différentes versions de His-SRA. Le NHS (pistes 1-8) ou le ³⁵S-apoL-I synthétisé

in vitro (pistes 9,10) est incubé avec la résine. Les protéines liées sont éluées soit avec de l'imidazole (pistes 1-4, 7-10) ou du deoxycholate (pistes 5,6), et révélée par coloration au bleu Coomassie (pistes 9-10). Les flèches doubles désignent des bandes spécifiquement liées avec du SRA fonctionnel, et les astérisques désignent les His-SRA élués.

b - Immunoprécipitation avec des anticorps anti-V5, ou des ^{35}S -SRA (48 kDa) synthétisés in vitro incubés ou non avec du ^{35}S -V5-apoL-I (42 kDa). Le rapport prévu de ^{35}S -méthionine entre ces protéines est de 4:9 .

c - Caractéristiques des protéines SRA et apoL-I :
SP = peptide signal; HT = terminaison hydrophobe; lignes interrompues = interaction entre les deux hélices.

La fig. 4 illustre l'activité lytique de l'apoL-I

a. incubation de ETat 1.2S avec différents sérums NHS (SRA-ft, L61P/I62P-ft, aApoL-ft = fraction passante du NHS ("flow through") à travers Sépharose -SRA , -L61P/I62P SRA et -anti-apoL-I, respectivement ; aApoL-el = éluat de la fraction liée à la Sépharose-anti-apoL-I)

b. incubation de ETat 1.2S dans soit SRA-ft ou FCS additionné de apoL-I recombinant (WT= wild type; C-del = sans le peptide C terminal 343-398) ou avec la fraction de cellules de contrôle CHO (ctl).

c. incubation de ETat 1.2SR dans le NHS ou SRA-ft additionné avec de l'apoL-I recombinante

d Incubation de différentes lignes de cellules dans le SRA-ft additionné ou non de apoL-I recombinante. le transformant pTSARib (Rib0, RibSRA) sont des formes pléomorphiques qui ne se développent pas dans ces conditions d'incubation.

5

Partie expérimentale :

10

- la transfection de SRA dans T. b. brucei lui permet de se développer dans le sérum humain. On a investigé les conditions minimales nécessaires pour la résistance conférée par le gène SRA. On a ainsi préparé des mutants qui ont été analysés pour caractériser l'expression de SRA et la sensibilité au sérum humain. On a aussi démontré que la N-glycosylation n'influence pas la résistance conférée par la protéine SRA. L'extrémité C et le signal d'anchoring peuvent aussi être éliminés sans que la résistance n'en soit affectée. Il en est de même du peptide signal N-terminal et de la région hydrophobe 98-118.

15

20

Ces résultats indiquent que les séquences minimales pour observer l'effet de résistance se situent soit entre aa32-97 et/ou entre aa 98-118. La première région est connue comme présentant une conformation en hélice amphipatique intervenant dans la dimérisation des VSG, des expériences de mutations ponctuelles ont été effectuées pour modifier ou détruire l'hélice. Deux double mutations indépendantes (L61P/I62P et I58Q/I62Q) conduisent à l'absence de résistance, contrairement à des mutations

25

30

dans une région adjacente (V40Q/V43Q/L47Q). On en déduit que la région d'hélice 54-65 est nécessaire pour conférer la résistance.

5 - On a démontré que l'interaction de l'ApoL-I et de la protéine SRA est de type "coiled-coil", c'est à dire au niveau des régions d'hélice de part et d'autre.

Dans ce but des expériences de chromatographie d'affinité ont été menées, en utilisant une protéine SRA (aa 1-251) avec l'extrémité N marquée à l'histidine (His-SRA),
10 immobilisée sur de l'agarose-acide trinitroacétique - Ni. Le traitement de sérum humain par chromatographie d'affinité comme susmentionné conduit à l'isolation d'une protéine de 40 kDa (doublet) qui est sélectivement retenue
15 dans diverses conditions (pH 7,5 ou 5,8, 0 ou 0,6 M NaCl). Ce doublet est attribué par spectrométrie de masse à l'ApoL-I, ce qui a été confirmé par traitement avec des anticorps anti-apoL-I.

Par contre, l'apoL-I n'a pas été isolée en utilisant les
20 mutants SRA L61P/I62P dont on sait qu'ils présentent une déformation de l'hélice originale. D'autres mutants fonctionnellement actifs (apte à conférer la résistance à l'action lytique du sérum sanguin) retiennent l'ApoL-I.

25 - Le gène de l'ApoL-I a été amplifié par RT-PCR à partir du RNA de cellules HepG2, puis cloné dans un vecteur d'expression. Différents mutants ont été ainsi produits, en se concentrant sur la séquence peptidique aa 343-355 connue comme désorganisant la membrane in vitro¹¹.

30 Deux versions tronquées de la protéine, à aa342 et aa355, ont été ainsi produites, ainsi qu'un mutant à effet déstabilisateur de lipides (L345Y/L352A/Y354L)¹¹.

Les versions ³⁵S de l'ApoL-I d'origine et les mutants ont été synthétisés et incubés avec du His-SRA.

DEMANDE REJETEE

-10-

La ³⁵S apoL est liée à la protéine native SRA. Aucune interaction n'a lieu avec les résines de contrôle ou d'autres protéines marquées à l'histidine.

5 L'apoL-I ne ne lie pas par contre au mutant SRA avec hélice désorganisée L61P/I62P et l'interaction est réduite de 50% avec le mutant I58Q/I62Q.

10 L'élimination de la partie terminale de l'apoL-I au delà de aa343 réduit l'interaction de 50%, alors que l'élimination au delà de aa356 et le mutant ponctuel L345Y/L352A/Y354L présentent une interaction de 24% à 67 %.

15 Ceci confirme que la région C-terminale de l'ApoL-I, qui contient une hélice alpha amphipatique, est importante pour l'interaction avec la protéine SRA.

20 Cette interaction a été confirmée sur la base d'une autre approche. L'incubation de apoL-I couplée à V5 conduit en effet à la co-immunoprécipitation de SRA en présence d'anticorps anti-V5.

25 Un peptide synthétique correspondant à l'hélice alpha de la protéine SRA (aa 54-65) interagit directement avec la région 345-355 de l'apoL-I car il supprime l'activité fusogène liposomique de l'apoL-I.

30 Cette interaction a également été confirmée par d'autres expériences au niveau de la délocalisation cellulaire de l'ApoL-I sous l'effet de la protéine SRA et par modélisation.

- L'effet lytique de l'apoL-I chez le trypanosome a également été amplement démontré.

La fractionnement du sérum NHS sur de la SRA-Sépharose, qui retient l'apoL-I, résulte chaque fois en une perte totale d'activité lytique de l'éluat, in vitro et chez la souris. Comme attendu cet effet n'a pas été observé avec des résines sans SRA ou contenant le mutant L61P/I62P.

Comme attendu, l'activité antilytique est également perdue si le NHS est traité par une colonne Sepharose comportant l'antiapoL-I.

On a constaté qu'il est plus facile d'éluer l'ApoL-I d'une colonne comprenant l'anticorps correspondant qu'une colonne contenant la protéine SRA. L'éluat ajouté à du sérum déjà traité à la SRA-Sépharose ou à l'antiapoL-I Sepharose, permet de rétablir complètement l'activité antilytique.

Pour être certain que l'apoL-I est responsable de cette reconstitution, on a exprimé une protéine recombinante His-apoL-I dans des cellules CHO et on l'a ajouté à du sérum traité à la SRA-Sépharose. L'addition de quantité physiologique (8 μ g/ml) de la protéine recombinante restaure l'activité lytique aussi bien vis à vis de T. b. brucei (AnTat 1.3A et pTSARib-0) que vis à vis de T. b. rhodiense ETat 1.2S, alors qu'un extrait équivalent de cellule CHO n'a pas d'effet.

On a de plus observé que l'activité lytique de l'ApoL-I est obtenu aussi dans du simple sérum de veau foetal.

L'activité lytique susmentionnée n'est pas observée vis à vis de cellules résistantes (T.b. rhodesiense ETat1.2R ou T.b.brucei pTSARib-SRA).

Dans les mêmes conditions, la protéine apoL-I sans sa région C-terminale 343-398 reste active contre les cellules sensibles au NHS, mais aussi contre les cellules résistantes au NHS.

5

Méthodes :

10

Obtention de trypanosomes transgéniques exprimant des protéines SRA mutantes

15

Le gène SRA dans PTSARib-SRA⁴ est modifié par mutagenèse orientée (Stratagene) et/ou digestion par endonuclease de restriction et ligation à des fragments de AnTat 11.7VSG¹⁶. Les plasmides résultants sont transfectés par électroporation dans des formes procycliques de T.b. brucei qui sont transmises en cycles par des mouches tsétsé afin d'obtenir les transformants sanguins.

20

Obtention des protéines SRA

25

Les protéines sont obtenues par traduction in vitro de RNA en utilisant BSDP140HA65-SRA¹⁷, ou par expression, dans Escherilia coli en utilisant pQE30 dans lequel le fragment 1-753bp du SRA est insérée entre BanHI et HindIII pour encoder un polypeptide marqué à l'histine N-terminal.

30

Dans ce dernier cas la protéine est solubilisée à partir de pellets d'extrait de celules soniquées, par incubation penant 1 h à température ambiante dans de l'urée 8M, 2mM mercaptoethanol, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris (pH8), suivi de dialyse vis à vis du même tampon contenant successivement de l'urée 0,5 M, de l'urée 0,1 M et finalement 1% de CHAPS

Obtention des anti-corps

Les anticorps anti-SRA ont obtenus par immunisation de lapin avec le polypeptide His-marqué 1-251, et purifié par affinité par liaison par passage sur filtres de nitrocellulose recouverts d'antigènes et élution acide. Pour l'analyse par immunofluorescence et l'analyse Western blot, ils ont été utilisés après dilution dans un rapport 1:2 et 1:100, respectivement. Les anticorps anti-apoL-I⁷ sont utilisés à une dilution de 1:20.000 .

Interaction de la protéine SRA avec le sérum

His-SRA (100µg) sous forme de recombinant du type original ou du mutant est incubé avec 500 µl de sérum NHS pendant 4h à 4° C dans NaCl 0,6 M, CHAPS 0,35 %, Mes (0,15 M (pH 5,8) avec un cocktail d'inhibiteurs de protease (sans EDTA, y compris la pepstatin, Roche) (tampon A). Le mélange est alors incubé pendant 30 min à 4°C avec 100 µl de billes Ni-NTA (Qiagen). Le traitement des billes, y compris l'élution de la matière liée avec de l'imlidazole 250 mM, est effectuée dans le tampon A comme décrit par Quiagen. Alternativement, His-SRA est couplé de manière covalente à de la CH Sepharose 4B activée (Pharmacia), et la matière liée est éluee dans 10 % de déoxycholate de Na, Tris 50 mM (pH 7,5).

Immunofluorescence

Les trypanosomes sont fixés pendant 10 min dans du paraformaldéhyde 3,7% et perméabilisés pendant 10 min dans du Triton X-100 0,1%. De la lectine de tomate-FITC (Sigma) et des anticorps secondaires anti-lapin FITC ou Texas Red sont utilisés. Pour détecter l'apoL-I, l'éluat deoxycholate de la SRA-Sepharose est couplé à Alexa 954

(Molecular Probes) après dialyse extensive et élimination de l'albumine sérique par filtration de gel, puis incubation avec des trypanosomes pendant 1h à 37°C.

5

Obtention de apoL-I natif

10

ApoL-I est obtenu par elution de serum NHS lié à de la Sépharose anti-apoL-I, en utilisant du CHAPS 5%, de la glycine à 0,1 M (pH 2,8) suivi de neutralisation avec du TRIS 1 M (pH 8,0). Les contaminants résiduels sont identifiés par chromatographie de masse.

Clonage de l'apoL-I

15

Le gène de l'apoL-I a été amplifié par RT-PCR en utilisant le RNA total de cellules HepG2 et les paires suivantes d'oligonucléotides ;

20

ApoL-F: 5'-TGTCCTCTGCGGTACCATGAGTGCACTTTCCTTGGTGTGAGAG-3'

ApoL-R: 5'-CCCTGCCCTGCTCGAGCAGTTCTTGGTCCGCCYGCAGAATC-3'.

25

Le fragment 1,15 kb est digéré par XpnI + XhoI et lié avec le pcGNA3/V5-HisA plasmide digéré par XpnI/XhoI. Les divers mutants sont générés par mutagenèse dirigée (SDtrategie), suivi de délétion/ligation pour enlever des fragments spécifiques.

Interaction du SRA avec de l'apoL-I synthétisé in-vitro

30

La ³⁵S-apoL-I est produit par traduction in vitro dans des lysats de réticulocytes, en utilisant pour la transcription la construction apoL-I-pcDNA3/1/VR-His ou de mutants dérivés. Tous les polypeptides apoL contiennent un marquage V5 à leur extrémité C, et ils ont été marqués ou

non avec une histidine C-terminale. Dans ce cas, 5 μ l de lysats de réticulocytes contenant du 35 S-apoL-I est incubé pendant 4 h à 4°C avec 15 μ g de His-RSA e tampon A. Un traitement consécutif avec des billes de Ni-NTA est mené comme susmentionné. L'apoL-I liée ou non liée est
5 rvélée par autoradiographie et quantifiée par comptage à scintillation après précipitation dans de l'acide trichloroacétique 10%.

10 Dissociation et reconstitution de l'activité trypanolytique du NHS

Le sérum non traité ou fractionné est ajouté à un milieu HMI-9 contenant 5% de CHAPS, jusqu'à concentration finale
15 de 25%. Après 2h d'incubation le CHAPS est éliminé par dialyse extensive. Les trypanosomes sont semés à 5.10^5 cellules/ml. Le résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences et ont été confirmés in vivo : lorsque
20 injectés directement dans des souris MNMRI, les mélanges d'incubation testés comme non-lytiques ou lytiques conduisent à des parasitaemie détectable après deux jours ou au moins 10 jours, respectivement.

25 References

- 30 1. Hager, K.M. et al. Endocytosis of a cytotoxic human high density lipoprotein results in disruption of acidic intracellular vesicles and subsequent killing of African trypanosomes. J. Cell Biol. 126, 155-167 (1994).
2. Raper, J., Portela, M.P., Lugli, E., Frevert, U. & Tomlinson, S. Trypanosome lytic factors: novel mediators of human innate immunity. Curr Opin Microbiol. 4, 402-408 (2001).

3. De Greef, C. & Hamers, R. The serum-resistance associated (SRA) gene of *Trypanosoma brucei rhodesiense* encodes a VSG-like protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 68, 277-284 (1994).
- 5 4. Xong, H.V., et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell* 95, 839-846 (1998).
- 10 5. Nolan, D.P., Geuskens, M. & Pays, E. N-linked glycans containing linear poly-N-acetyllactosamine as sorting signals in endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *Curr. Biol.* 9, 1169-1172 (1999).
6. Blum M.L., et al. A structural motif in the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature* 362, 603-609 (1993).
- 15 7. Duchateau, P.N., et al. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J Biol Chem.* 272, 25576-25582 (1997).
- 20 8. Page, N.M., Butlin, D.J., Lomthaisong, K. & Lowry, P.J. The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. *Genomics* 74, 71-78 (2001).
- 25 9. Duchateau, P.N., Pullinger, C.R., Cho, M.H., Eng, C. & Kane, J.P. Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J. Lipid Res.* 42, 620-630 (2001).
- 30 10. Lins, L., Charloteaux, B., Thomas, A. & Brasseur, R. Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins* 44, 435-447 (2001).

11. Monajemi, H., Fontijn, R.D., Pannekoek, H., & Horrevoets, A.J. The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics* 79, 539-546 (2002).
- 5 12. Smith, A.B., Esko, J.D., & Hajduk, S.L. Killing of trypanosomes by the human haptoglobin-related protein. *Science* 268, 284-286 (1995).
13. Hatada, S., et al. No trypanosome lytic activity in the sera of mice producing human haptoglobin-related protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 291-294 (2002).
- 10 14. Drain, J., Bishop, J.R. & Hajduk, S.L. Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 30254-30260 (2001).
- 15 15. Do Thi, C.D., Aerts, D., Steinert, M., & Pays, E. High homology between variant surface glycoprotein gene expression sites of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma gambiense*. *Mol Biochem Parasitol.* 48, 199-210 (1991).
- 20 16. Salmon, D., et al. A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG expression site-associated genes in *T. brucei*. *Cell* 78, 75-86 (1994).
17. Guex, N., & Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 14-23 (1997).
- 25 18. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., & Thornton, J.M. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291 (1993).
19. Rahman, M., & Brasseur, R. WinMGM: a fast CPK molecular graphics program for analyzing molecular structure. *J. Mol. Graphics* 12, 212-218 (1994).

Revendications :

- 1 - Utilisation à but thérapeutique, diagnostique ou prophylactique, d'un composé comprenant une chaîne polypeptidique reproduisant substantiellement au moins une partie substantielle de la séquence de l'apolipoprotéine L-I (ApoL-I).
- 2 - Utilisation à but thérapeutique, diagnostique ou prophylactique, de l'ApoL, ses variants, mutants et sous-peptides.
- 3 - Utilisation selon la revendication 1 ou 2 dans laquelle la séquence est la séquence aa1-342.
- 4 - Utilisation selon la revendication 1 ou 2 dans laquelle la séquence est la séquence aa343-398 ou 340-362.
- 5 - Utilisation selon la revendication 1 dans laquelle la séquence est la séquence aa356-398.
- 6 - Utilisation selon n'importe laquelle des revendications précédentes pour le traitement, le diagnostic ou la prophylaxie des infections par trypanosomes.
7. - Utilisation selon la revendication précédente dans laquelle les trypanosomes sont résistants au sérum humain de la protéine ApoL-I, ses variants, mutants ou peptides dérivés.
- 8 - Utilisation selon la revendication 2 comme agent de prévention des maladies cardiovasculaires.

- 5 9 - Composé comprenant une chaîne polypeptidique reproduisant substantiellement au moins une partie substantielle de la séquence aa1-342 de l'apolipoprotéine L-I.
- 10 10 - Composé selon la revendication précédente caractérisé en ce qu'il s'agit d'une protéine modifiée dont la séquence reproduit substantiellement la séquence aa1-342 de l'apoprotéine L-1.
- 15 11 - Composé comprenant une chaîne polypeptidique reproduisant substantiellement la séquence 343-398 de l'apolipoprotéine L-1.
- 12 - Composé comprenant une chaîne polypeptidique reproduisant substantiellement la séquence de la protéine RSA.
- 20 13 - Polynucléotide encodant n'importe laquelle des protéines ou polypeptides selon les revendications précédentes.
- 25 14 - Kit diagnostique faisant intervenir une apolipoprotéine, une protéine SRA et/ou un anticorps correspondant.
- 30 15 - Utilisation à but thérapeutique, diagnostique ou prophylactique, d'un composé comprenant une chaîne polypeptidique reproduisant substantiellement au moins une partie substantielle de la séquence de la protéine SRA.

- 16 - Procédé de purification de l'apoL-I comprenant l'étape d'association de cette protéine à une protéine SRA, par exemple fixée sur une résine adéquate.
- 5 17 - Procédé de purification d'un dérivé de l'apoL-I comprenant l'étape d'association de ce dérivé à une protéine SRA, par exemple fixée sur une résine adéquate (chromatographie d'affinité).
- 10 18 - Peptide et utilisation d'un peptide reproduisant essentiellement la séquence 32-97 de la protéine SRA pour la purification de la protéine ApoL-I ou un dérivé de celle-ci.
- 15 19 - Peptide et utilisation d'un peptide reproduisant essentiellement la séquence 54-65 de la protéine SRA pour la purification de la protéine ApoL-I ou un dérivé de celle-ci.
- 20 20 - Bovidé, en particulier bovin, transgénique produisant de l'apoL-I ou une protéine ou peptide actif de séquence substantiellement similaire à un fragment de séquence de l'apoL-I, par exemple la séquence aa1-342.
- 25 21 - Bovidé selon la revendication précédente dans lequel l'apoL-I est produit par un gène sous dépendance d'un promoteur de transcription de cellules endothéliales.
- 30 22 - Peptide répondant à la formule LALDVVYLVYES, PVSFFLALDVVYLVYESKHLHEG ou ALAKINNLIKQ.

DEMANDE REJETEE

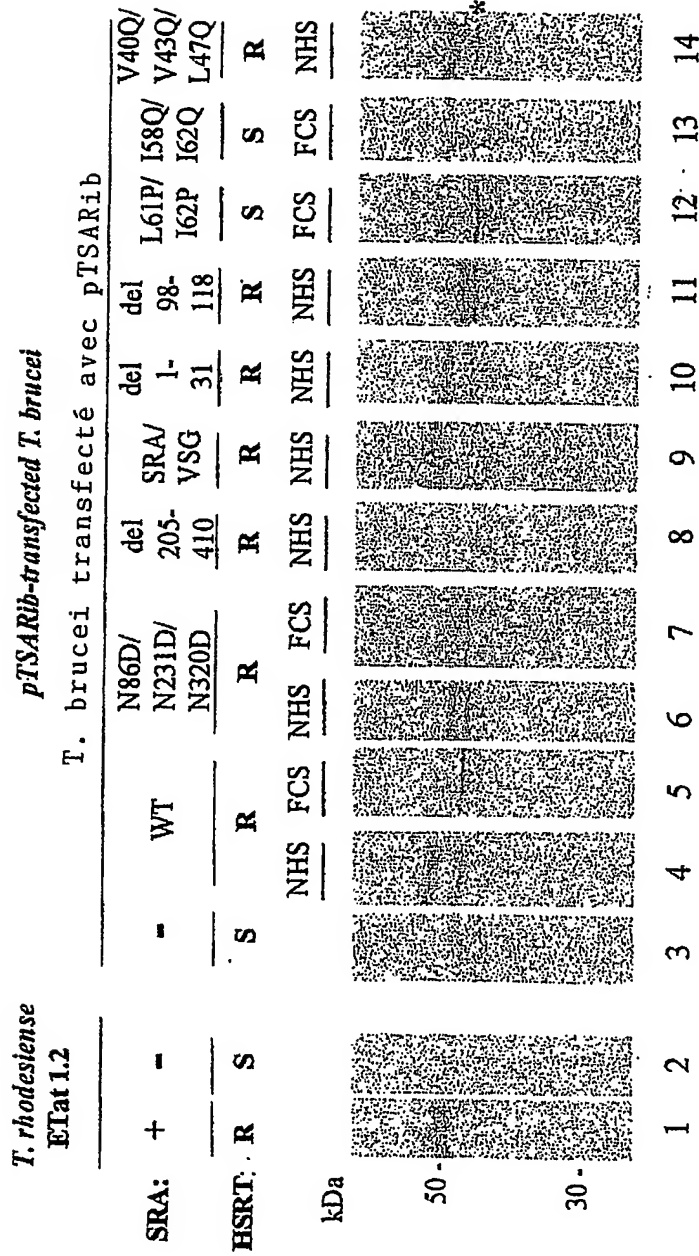


FIG. 1

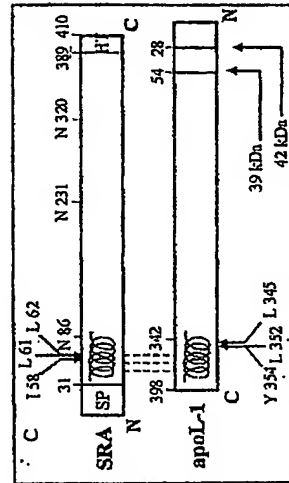
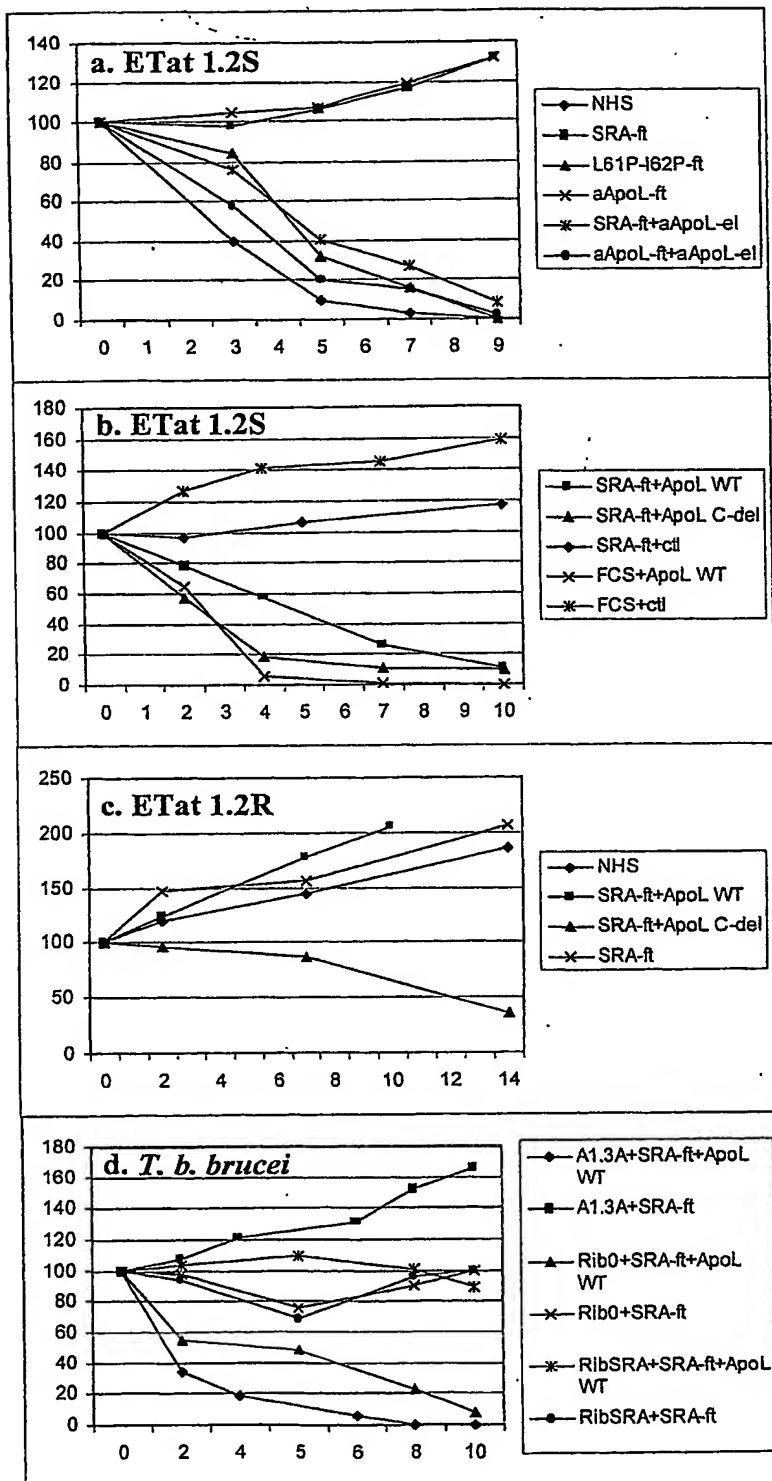


FIG. 2

Trypanosome (%)



TEMPS (HEURES)

FIG. 3